

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
AO 5210

ARTICLE PRINCIPAL

Recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

de PARIS

par

Monsieur Claude NADAL

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la thèse : POLYPLOIDIE HEPATIQUE DU RAT
Etude cytologique et physiologique de
son développement et de son déterminisme.

soutenue le 28 janvier 1971

devant la Commission d'Examen

MM. COUTEAUX
DROZ
ZAJDELA

Président
Examineurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

d'enregistrement
au C.N.R.S.
AO 5210

ARTICLE PRINCIPAL

Recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES
de PARIS

par

Monsieur Claude NADAL

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la thèse : POLYPLOIDIE HEPATIQUE DU RAT
Etude cytologique et physiologique de
son développement et de son déterminisme.

Soutenue le 28 janvier 1971

devant la Commission d'Examen

MM.	COUTEAUX	Président
	DROZ	Examineurs
	ZAJDELA	

UNIVERSITY OF
LEIDEN
3210

ARTICLE PREMIER

Le Président de l'Université

Le Recteur de l'Université

Le Vice-Recteur

Le Doyen de la Faculté de Droit

Le Doyen de la Faculté de Médecine

Le Doyen de la Faculté de Théologie

Le Doyen de la Faculté de Lettres

Le Doyen de la Faculté de Sciences

Le Doyen de la Faculté de Philosophie



de la Faculté de Théologie

de la Faculté de Médecine

de la Faculté de Lettres

le 25 Janvier 1911

Le Doyen de la Faculté de Philosophie

Le Doyen de la Faculté de Sciences

Le Doyen de la Faculté de Lettres

Le Doyen de la Faculté de Médecine

Le Doyen de la Faculté de Théologie

Contrôle de la multiplication et de la polyploïdie des hépatocytes du rat

Étude des perturbations de la régulation physiologique causées
par l'injection de produits irritants

C. NADAL

Unité de Physiologie Cellulaire, Inserm, Institut du Radium, Orsay (91), France

Reçu le 25 Avril 1970

Control of Multiplication and Polyploidy of Rat Hepatocytes

A study of the Perturbations of Physiological Regulation Induced by Injection of Irritants

Summary. The injection of irritating substances of various chemical nature disturbs the mechanisms regulating the multiplication of rat hepatocytes.

The reaction of baby rats is intense and reproducible. It results, 15 hours after the injection, in an increase of the number of cells entering the S phase, so that practically all the divisions which would normally have been scattered over 36 hours are initiated within 2 hours. This burst of synchronized mitosis corresponding to a 36 hours advance in the hepatic growth is followed by a decrease of mitoses due to a feed-back inhibition.

The reaction of older rats brings to evidence a permanent inhibitory mechanism that results in a less regular and intensive response.

The production of binucleated and polyploid hepatocytes seems to be correlated to this inhibitory mechanism.

The regularity and sensivity of the baby rat reactions make them a choice material for the study of hepatic growth.

Résumé. L'injection de substances irritantes de nature chimique variée perturbe les mécanismes qui contrôlent la multiplication des hépatocytes du rat.

Les très jeunes rats réagissent de façon intense et reproductible. 15 heures après l'injection il se produit une augmentation brève et intense du nombre des cellules entrant en phase S de sorte que les divisions cellulaires, qui normalement auraient été réparties sur les 30 ou 40 prochaines heures, débutent en l'espace de 2 heures seulement. La croissance hépatique a pris une importante avance qui est suivie par une période de diminution du nombre des mitoses due à une rétroaction inhibitrice.

La réaction des rats plus âgés met en évidence un mécanisme inhibiteur permanent qui entraîne une réponse moins intense et moins régulière.

La production d'hépatocytes binucléés et polyploïdes paraît liée à ce mécanisme inhibiteur.

La régularité et la sensibilité des réactions des très jeunes rats en fait un matériel de choix pour l'étude des mécanismes régulateurs de la croissance hépatique.

Introduction

Le foie se prête particulièrement bien à l'étude des problèmes de régulation de croissance et d'équilibre, entre un organe et le reste du corps. Les deux faits expérimentaux majeurs sont la reconstitution rapide de la masse de parenchyme hépatique après ablation chirurgicale ou nécrose toxique et la polyploïdisation des cellules hépatiques qui apparaît au cours de la croissance du foie.

Jacobj (1925) a ouvert le chapitre de la polyploïdie des hépatocytes. Celle-ci a été surtout étudiée chez le rat et chez la souris mais le phénomène est présent chez tous les mammifères. A la naissance les cellules hépatiques sont pratiquement toutes mononucléées diploïdes ($2n$) puis une diversification intervient au cours de la croissance et, chez l'adulte, la population dominante est celle des cellules mononucléées tétraploïdes ($4n$) qui coexistent avec des cellules mononucléées et binucléées diploïdes, binucléées tétraploïdes, ou mononucléées et plus rarement binucléées octoploïdes ($8n$) (Revue générale et bibliographie exhaustive par Carrière, 1969). La cellule binucléée a un rôle particulier. Elle est le premier stade du processus de polyploïdisation. Sa division se fait par une mitose à un seul fuseau (Beams et King, 1942) et donne naissance à un clone de cellules polyploïdes (Nadal et Zajdela, 1966a, fig. 9).

La recherche des facteurs responsables du développement de la polyploïdie hépatique a surtout été dirigée vers les facteurs hormonaux et diététiques, mais ceux-ci n'ont qu'un rôle indirect par l'intermédiaire de la croissance générale de l'organisme (Nadal et Zajdela, 1966b).

Les divisions cellulaires sont très rares dans le foie adulte mais une hépatectomie partielle provoque une multiplication cellulaire rapide qui reconstitue en quelques jours la masse de l'organe (Revue générale de Bucher, 1963). La rapidité et la précision du phénomène impliquent un mécanisme de régulation. L'existence de facteurs circulant par voie sanguine a été généralement acceptée à la suite d'un certain nombre d'expérimentations effectuées chez le rat, dont les résultats ne sont cependant pas tous concordants: parabiose (revue de Bucher, 1963), circulation croisée jugulocarotidienne (Alston et Thompson, 1963; Moolten et Bucher, 1967), greffe hétérotopique du foie (Virolainen, 1964; Leong, Grisham, Hole et Albright, 1964), plasmaphérèse (Glinos et Gey, 1952; Naora et Naora, 1957; Sudweeks et Hill, 1967).

Ceci a conduit à injecter aux rats des produits biologiques variés, et en premier lieu du sérum sanguin, pour détecter les éventuels facteurs de régulation. Le sang est prélevé chez des rats adultes, normaux ou en cours d'hypertrophie compensatrice après hépatectomie partielle. Le sérum est injecté à des animaux receveurs dont on mesure le pourcentage de cellules hépatiques en division (mitoses ou noyaux marqués par la thymidine tritiée). Ceux-ci peuvent être des rats adultes normaux, qui ont très peu de divisions cellulaires dans leur foie, ou des rats hépatectomisés dont les lobes restants présentent une forte poussée de mitoses.

Le tableau I indique les principaux résultats obtenus chez le rat. On voit que le sérum de rat adulte a pour certains une action inhibitrice sur les divisions cellulaires hépatiques mais celle-ci n'est pas retrouvée par tous. Le sérum de rat après hépatectomie partielle a une activité le plus souvent stimulante mais pour certains expérimentateurs elle est nulle ou même inhibitrice. Des broyats ou des extraits de foie ont aussi été employés. Leur injection à des rats adultes stimule les divisions cellulaires hépatiques surtout s'il s'agit de foie de rat jeune, celui des rats adultes étant moins actif (Teir et Ravanti, 1953; Blomkvist, 1957). L'action sur les rats qui ont subi une hépatectomie partielle est diversement appréciée. Pour McJaquin et Breuhaus (1931) la régénération est accélérée, mais pour Saetren (1956), Stich et Florian (1958), Molimard (1959) elle est inhibée par l'injection de broyats de foie.

Ces résultats sont, dans l'ensemble, décevants. Les contradictions ou le manque de constance des résultats peuvent venir en partie des différences entre les protocoles expérimentaux, notamment entre les délais de prélèvement, d'injection et de sacrifice. Weinbren (1959) a insisté sur le fait que l'activité attribuée à un produit est en général basée sur l'effet constaté à un seul délai après son injection alors qu'il faudrait connaître la cinétique complète de la réaction du receveur.

Un autre facteur d'erreur se trouve dans les importantes fluctuations de l'activité mitotique spontanée des rats adultes.

D'autre part, Wilson et Leduc (1947) ont montré qu'il est possible d'augmenter le nombre des mitoses hépatiques de la souris par injection de divers extraits d'organes, mais aussi de jaune d'œuf. L'intervention de mécanismes indépendants de la nature chimique de la substance injectée explique vraisemblablement une grande partie des divergences expérimentales.

Des réactions non spécifiques interviennent également dans le développement du processus de polyplôidie hépatique. Rigler (1963) a montré que l'injection sous-cutanée d'une solution alcaline de caséine à des souris adultes augmente l'index mitotique du parenchyme hépatique et provoque l'apparition d'un grand nombre de cellules binucléées et polyplôides. Cette réaction se retrouve chez les rats jeunes mais non chez les adultes (Nadal, 1965).

Quelques essais personnels, eux aussi contradictoires, nous ont amené à penser qu'il était de peu d'utilité de continuer la recherche des mécanismes impliqués dans le contrôle des divisions des hépatocytes ou de leur polyplôidisation sans avoir fait préalablement une étude systématique des réactions non spécifiques pouvant être induites par n'importe quel produit irritant.

Nous avons souligné dans des publications précédentes (Nadal et Zajdela, 1966a, b) l'intérêt de distinguer les deux principales étapes de la multiplication des cellules hépatiques au cours de la croissance du rat. La première, particulièrement intéressante, correspond aux trois premières semaines de la vie de l'animal. La population d'hépatocytes, presque exclusivement formée de cellules mononucléées diploïdes, se multiplie en reproduisant des cellules du même type. La seconde étape s'étend de la quatrième semaine à la fin de la vie de l'animal. La multiplication des hépatocytes s'accompagne de la formation d'un nombre important de cellules binucléées, qui donnent ensuite naissance à des cellules polyplôides.

Ceci nous a amené à faire une exploration systématique des réactions du parenchyme hépatique, après injection de produits irritants divers et aux étapes successives de la vie des rats, pour essayer de comprendre comment une agression aspécifique peut interférer avec les mécanismes d'homéostasie hépatique normalement présents. Nous avons tenté par la même occasion de jeter les bases d'une méthode d'étude de ces mécanismes qui donne des résultats reproductibles et ne prête pas aux hésitations par la faible ampleur des variations.

Techniques

Animaux. Les rats, de race Wistar, sont élevés à l'Institut du Radium. Les produits à étudier sont injectés par voie sous-cutanée dans la région cervico-dorsale. La solution de caséine est obtenue en ajoutant 3,5 g de caséine à 100 ml d'une solution aqueuse de NaOH à

0,3%. Les variations de cette technique de base, notamment les autres produits ou voies d'injection, seront indiquées dans la suite du texte.

Histologie. Fixation par le formaldéhyde à 4% neutralisé contenant du NaCl à 90/00. Déshydratation et inclusion dans la paraffine. Les coupes de 5 μ sont colorées par hémalum-éosine-safran.

Les cellules hépatiques en mitose sont comptées dans un nombre de champs microscopiques correspondant à 50000 cellules, répartis dans les différents lobes. Si les mitoses sont nombreuses le comptage est arrêté à 100 mitoses.

Radioautographie. La thymidine 6T d'activité spécifique 5 Ci/mM est injectée par voie intrapéritonéale à la dose de 1 μ Ci par gramme de poids corporel. Le délai entre l'injection de Thymidine et le sacrifice de l'animal est, de 30 minutes pour évaluer le nombre des noyaux en phase S, et de 20 heures pour la formation des cellules binucléées. Les pièces sont traitées selon la méthode histologique décrite plus haut. Les composés tritiés non fixés sur le DNA sont éliminés au cours de la fixation, du lavage et de la déshydratation et le marquage est exclusivement nucléaire. Les coupes sont recouvertes d'émulsion K5 Ilford, diluée de moitié avec de l'eau distillée. Le temps d'exposition est de trois à six semaines. Après coloration, dans l'hémalum dilué (2 à 3 heures à 5°), le comptage des noyaux marqués est fait dans un nombre de champs microscopiques correspondant à 10000 cellules.

Resultats

I. Evolution du nombre de divisions des cellules hépatiques après injection sous-cutanée de solution de caséine chez des rats âgés de 7 à 10 jours

Les jeunes rats sont groupés par lots de quatre rats d'une même portée. Deux reçoivent une injection sous-cutanée de 0,4 ml de sérum physiologique et servent de témoins; les deux autres reçoivent par la même voie, 0,4 ml de solution de caséine et présentent un syndrome inflammatoire localisé avec induration qui disparaît, sans nécrose ni suppuration, si l'injection est bien sous-cutanée. La croissance par rapport aux témoins n'est pas retardée.

Les rats sont sacrifiés à des délais variables après l'injection. Les techniques histologique et radioautographique permettent d'évaluer le pourcentage des cellules en mitose ou en phase S. Les résultats sont exprimés de deux façons. Le tableau 2 indique le nombre de cellules marquées pour 10000 cellules hépatiques de 3 groupes expérimentaux, à plusieurs temps après l'injection et permet de comparer la réaction de ces rats avec celle de rats plus âgés.

La fig. 1 montre la cinétique complète de la réaction après injection de solution de caséine. Pour disposer plus facilement sur une même courbe les résultats de rats provenant de portées dont le rythme de croissance est différent, les résultats concernant les noyaux marqués et les mitoses sont exprimés en fonction de la valeur moyenne des témoins, du même groupe. Les valeurs moyennes des témoins de chaque groupe ont par définition la valeur 1 et se placent sur la droite horizontale d'ordonnée 1. Les résultats des rats injectés de solution de caséine ont pour valeur:

$$\frac{\text{Valeur constatée rat-caséine}}{\text{Valeur moyenne témoins du groupe}}$$

Les constatations suivantes peuvent être faites:

— Pendant les 15 premières heures après l'injection de la solution de caséine, il y a peu de variations du nombre des mitoses et des noyaux en phase S, mise à part une légère baisse possible vers la 12^e heure, se situant autour de 0,75 de la valeur des témoins.

Tableau 1. *Effet des injections de sérum sur le nombre de divisions des hépatocytes. Principaux résultats obtenus chez le rat*

Produit injecté	Auteurs	Effet sur l'animal receveur	
		rat adulte normal	rat adulte hépatectomisé
Sérum de rat adulte	Glinos (1958b)		0
	Smythe et Moore (1958)	—	—
	Stich et Florian (1958)		—
	Hughes (1960)	0	
	Mac Donald et Rogers (1961)	0	0
	Bucher (1963)		0
	Moya (1963)	—	—
	Jackson et Bohnel (1964)		—
	Grisham, Leong, Albright, Emerson (1966)	0	—
Sérum de rat hépatectomisé	Friedrich-Freska et Zaki (1954)	+	
	Horvath et Kovaks (1956)	+	
	Glinos (1958a)	0	
	Stich et Florian (1958)		+
	Smythe et Moore (1958)	+	+
	Adibi, Paschkis, Cantarow (1959)		+
	Hughes (1960)	+	
	Laquerriere et Laumonier (1960)	+	
	Stich (1960)	0	
	Zimmerman et Celozzi (1960)	+	
	Mac Donald et Rogers (1961)	0	0
	Van Lancker et Borrisson (1961)	+	
	Survis, Kennedy et Hass (1962)	+	
	Bucher (1963)		0
	Moya (1963)	—	—
	Grisham, Leong, Albright, Emerson (1966)	0	— ou 0

+ = augmentation; — = diminution; 0 = absence de variation.

— Entre la 15^e et la 18^e heure survient une montée extrêmement rapide du nombre des noyaux en phase S qui est multiplié par 5 en 2 heures. Un léger décalage est possible selon les séries.

La courbe reste en plateau entre la 18^e et la 23^e heure. Elle descend rapidement à partir de la 24^e heure, mais de façon plus échelonnée que pendant la montée. L'intervalle de temps qui sépare les points à mi-hauteur du clocher est de 9 heures, ce qui correspond à la durée de la phase S des cellules hépatiques du rat (Looney, 1960; Post et Hoffman, 1964). La courbe du nombre des mitoses présente un pic plus aigu que celle des noyaux marqués avec une valeur atteignant 10 fois le chiffre des témoins autour de la 27^e heure (points sortant de la figure). La mitose a en effet une durée plus courte que la phase S.

— Le nombre des noyaux marqués continue à baisser rapidement jusque vers la 36^e heure. Le minimum se situe entre les 48^e et 60^e heures, avec 0,10 à 0,20 de la valeur des témoins. La remontée est progressive, le retour à la normale se fait vers le 5^e jour. La courbe des mitoses suit celle des noyaux marqués.

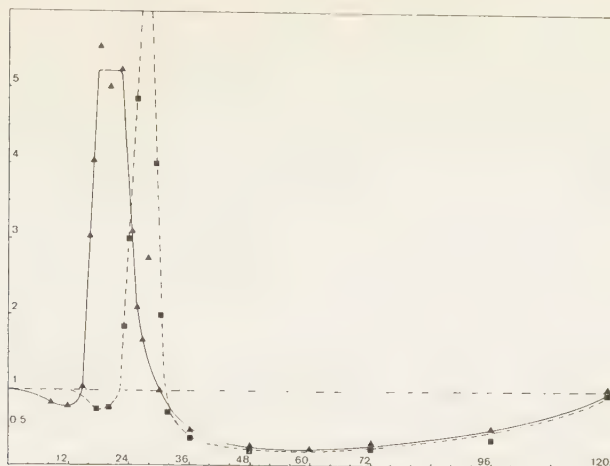


Fig. 1. Abscisse: temps en heures. — Ordonnée: la valeur des témoins sert d'unité de mesure. — Evolution du nombre des hépatocytes en phase S et des mitoses chez des rats âgés de 7 à 10 jours, sacrifiés à divers temps après injection sous-cutanée de solution alcaline de caséine (▲ cellules en phase S, ■ mitoses. Les résultats sont exprimés par le rapport $\frac{\text{Valeur des rats injectés}}{\text{Valeur des témoins}}$ et les témoins se placent par définition sur la droite d'ordonnée 1)

On peut déduire de ces résultats les variations du nombre des cellules qui entrent en phase S. La phase S des cellules hépatiques dure 8 à 9 heures. En régime d'équilibre le compartiment des cellules qui incorporent la thymidine tritiée ne varie pas. Les entrées compensent la sortie en phase G2 des cellules introduites 8 à 9 heures plus tôt et le compartiment comprend un mélange d'hépatocytes à divers stades de leur phase S. Si on prend pour unité de compte le nombre des cellules entrant en phase S pendant chaque heure chez les témoins, supposés en régime d'équilibre, le compartiment des cellules en phase S contient les hépatocytes entrés pendant 8 à 9 heures consécutives et sa valeur est de 8 à 9 unités de compte.

Chez les rats injectés de solution de caséine ce compartiment quintuple en 2 heures. Il passe donc de 8 ou 9 à 5×8 ou 5×9 unités de compte, c'est-à-dire 40 ou 45. Comme les sorties ont continué (2 unités en 2 heures) ceci implique l'entrée de 34 à 38 unités, soit 17 à 19 fois plus que le régime d'équilibre. Après cet accroissement, brutal mais bref, le nombre des cellules entrant en phase S doit redescendre à un niveau très bas et s'y maintenir pendant plusieurs jours car le compartiment des cellules en phase S, qui contient pendant la durée du plateau une population de cellules à peu près synchrones, se vide dès que prend fin leur phase S.

Deux remarques peuvent être faites: après cette poussée de divisions cellulaires la croissance hépatique a pris une trentaine d'heures d'avance; si on mesure la surface des zones de stimulation et de dépression situées entre la courbe du nombre des noyaux marqués et la ligne des témoins, de part et d'autre de cette dernière, on voit que la dépression est plus importante que la stimulation malgré l'absence de retard de croissance par rapport aux témoins.

Diverses expérimentations complémentaires effectuées par la suite nous ont permis de vérifier que cette réaction est tout à fait constante dans sa chronologie et son intensité. Notamment, la reproductibilité de la période de stimulation est attestée par les témoins des expériences des paragraphes VI et VII, et celle de la période d'inhibition qui la suit par les témoins des expériences des paragraphes IV et VII.

II. Evolution du nombre de divisions des cellules hépatiques après injection sous-cutanée de solution de caséine chez des rats âgés de 22 à 26 jours et de 30 à 40 jours

Les rats de 22 à 26 jours (50 à 80 g) reçoivent deux injections sous-cutanées simultanées de 0,5 ml de solution de caséine en 2 points différents de la région dorsale, ceux de 30 à 40 jours (80 à 150 g) trois injections de 0,8 ml. Les rats d'une même portée sont injectés par groupes de deux, à des délais variables avant le sacrifice et sont comparés à un groupe témoin de la même portée. Le tableau 2 indique le nombre de cellules en phase S pour 10000 cellules, dans plusieurs portées dont les résultats sont présentés sur des lignes différentes par suite du manque d'homogénéité des portées et de leurs réactions; chaque valeur est la moyenne de deux rats. La première phase, très différente de celle des animaux du paragraphe précédent, est marquée par une chute très importante du nombre des noyaux en phase S autour de la 12^e heure. La stimulation est beaucoup moins forte que chez les rats de 7 à 10 jours et survient avec un retard de quelques heures. Elle n'est d'ailleurs pas constante et peut être remplacée par une inhibition qui continue celle de la première phase.

III. Evolution du nombre de divisions des cellules hépatiques après injection sous-cutanée de solution de caséine chez des rats adultes (4 à 12 mois)

Les expériences sont conduites comme celles du paragraphe précédent sauf qu'il ne s'agit pas de portées mais de groupes de rats de même âge et de même sexe, élevés dans la même cage depuis la fin de l'allaitement. Les rats reçoivent trois injections sous-cutanées simultanées de 2 ml de solution de caséine. Les résultats de chaque groupe sont exprimés sur une ligne différente.

L'inhibition précoce ne peut être nette que s'il y a un nombre suffisant de noyaux marqués chez les témoins. La stimulation, plus tardive que chez les jeunes rats, reste modérée et variable. Elle est beaucoup plus nette chez les femelles.

IV. Evolution du nombre de divisions des cellules hépatiques après une seconde injection de solution de caséine chez des rats de 7 à 10 jours

Une seconde injection de 0,4 ml de solution de caséine est faite dans un territoire cutané différent (dorsal postérieur) à des temps variables après la première.

Le tableau 2 donne les résultats par comparaison avec les témoins de la même portée qui n'ont reçu que la première injection. D'autres rats de la même portée n'ayant pas reçu la première injection sont expérimentés simultanément pour vérifier qu'une première injection entraîne la réaction habituelle.

Tableau 2. *Evolution du nombre de cellules hépatiques en phase S pour 10 000 chez des rats injectés de solution alcaline de caséine par voie sous-cutanée (pour les rats de 7 à 10 jours, injection unique, chaque chiffre correspond à un groupe de 2 rats et les témoins sont au nombre de 42. Pour les autres groupes chaque ligne correspond à une expérience distincte et chaque valeur est la moyenne de 2 rats)*

AGE et modalités expérimentales	Délai après injection (heures)							
	témoins	12-14	18-20	24-26	30	36	48	72
7 à 10 jours	330 ± 12 ^a	245	1200	1200	280	75	145	100
(injection unique)	—	260	1850	1300	230	125	85	55
	—	275	2150	800	180	175	60	25
7 à 10 jours								
réinjection								
42 heures	35 ^b	28	324	115	—	—	—	—
84 heures	220 ^b	120	400	330	—	—	110	—
5 jours	400 ^b	180	500	350	—	—	—	—
9 jours	300 ^b	120	490	1400	—			
après la première								
22 à 26 jours	280	160	700	730	—	—	51	38
	60	38	135	—	37	—	—	—
	370	22	—	200	—			
	151	9	—	22	—	—	—	—
30 à 40 jours	180	36	45	230	—	—	17	—
	13	4	80	180	—	3	—	—
	6	3	13	60	8	—	—	—
	7	1	6	6	3	2	—	—
	32	18	225	—	—	—	—	—
	113	28	235	—	—	—	—	—
Adultes								
♂	35	4	14	69	—	31	4	—
♀	22	6	190	259	—	257	101	—
♂	1	—	—	3	1	3	—	—
♀	1	—	—	17	23	260	—	—

^a Ecart type de la moyenne.

^b Ces témoins ont reçu la première injection de solution de caséine.

L'évolution, très différente de celle après une première injection, s'apparente à celle des rats plus âgés. Il apparaît une phase d'inhibition précoce, nette lorsque le nombre des noyaux marqués redevient important, et la stimulation est faible.

Les rats réinjectés le 9^e jour n'ont pas encore repris un comportement normal. Le faible effet d'une réinjection n'est pas imputable à une perte de l'aptitude à réagir du tissu sous-cutané, car une réinjection intrapéritonéale n'est pas plus efficace.

V. *Evolution du nombre de divisions des cellules hépatiques après injection intrapéritonéale de solution de caséine*

Chez les rats de 7 à 10 jours, l'injection de solution de caséine par voie intrapéritonéale est moins bien supportée que par voie cutanée. La mortalité est de l'ordre de 10 % avec des doses de 0,4 ml. L'effet produit sur le nombre de divisions

des cellules hépatiques est très voisin de celui de la voie sous-cutanée. On observe la même augmentation rapide, entre 16 et 18 heures, du nombre des noyaux marqués par la thymidine tritiée, atteignant 5 fois le chiffre des témoins, avec le même plateau jusqu'à la 24^e heure. Ensuite la descente est plus lente, le pourcentage des témoins n'est atteint que vers 48 heures et on voit même dans quelques cas se produire entre 38 et 46 heures une seconde élévation du nombre des noyaux marqués aussi intense que la première. Chez les rats adultes, la voie intrapéritonéale n'est pas plus efficace que la voie sous-cutanée.

VI. *Activité de divers produits*

Des produits de nature chimique variée ont été injectés (0,5 ml par voie sous-cutanée) à des rats de 7 à 10 jours qui ont été sacrifiés 20 heures après, c'est à dire au milieu de la période d'augmentation de la fréquence du nombre des noyaux marqués. Le coefficient d'accroissement du nombre des cellules en phase S par rapport aux témoins a été le suivant (moyenne de 4 rats).

Caséine 3,5% + NaOH 0,3% = 6 ×	Adjuvant Freund incomplet = 5 ×
NaOH 0,3% = 3 ×	Empois d'amidon = 3 ×
Ovalbumine 3,5% + NaOH 0,3% = 6,5 ×	Gomme adragante = 3 ×
Ovalbumine 3,5% = 4,5 ×	Hématies isologues lavées = 3,5 ×
	Essence de Térébenthine (0,1 ml) = 6 ×

VII. *Evolution du nombre de divisions cellulaires dans d'autres organes que le foie, après injection sous-cutanée de solution de caséine à des rats de 7 à 10 jours.*

Les noyaux marqués ont été dénombrés dans deux tissus différents, en même temps que dans le foie, chez des rats de 7 à 10 jours à trois délais après injection sous-cutanée de 0,5 ml de solution de caséine. Les résultats sont exprimés de la façon suivante :

- foie = nombre de cellules hépatiques en phase S pour 10000 cellules.
- rein, tubes contournés = nombre de cellules en phase S par 10 champs.
- pancréas exocrine = nombre de cellules en phase S pour 50 acini.

Chaque chiffre est la moyenne de trois rats (tableau 3). On voit qu'il n'apparaît pas de variations nettes dans ces deux tissus.

VIII. *Production de cellules binucléées chez les rats de 7 à 10 jours ayant reçu une injection sous-cutanée de solution de caséine*

Pour évaluer la production de cellules binucléées, la thymidine tritiée est injectée 20 heures avant le sacrifice des rats. Les cellules marquées pendant la phase S ont eu le temps de terminer leurs divisions et il est possible de déterminer la proportion de cellules mononucléées ou binucléées parmi les cellules filles.

Chez les rats témoins âgés de 7 à 10 jours, les cellules binucléées représentent moins de 1% de la population des cellules filles. Chez les rats traités par une injection sous-cutanée de 0,5 ml de solution de caséine, la production de cellules binucléées est fonction du délai qui s'est écoulé entre l'injection de solution de caséine et celle de thymidine tritiée. Les chiffres suivants indiquent cette produc-

Tableau 3. *Evolution du nombre de noyaux en phase S après injection sous-cutanée de 0,5 ml de solution de caséine à des rats de 7 à 10 jours (les noyaux en phase S correspondent dans le foie à 10000 cellules, dans le rein à 10 champs microscopiques et dans le pancréas à 50 acini—Chaque valeur est la moyenne de 3 rats)*

Délai après injection (heures)		Foie	Rein (tubes contournés)	Pancreas exocrine
19	Témoins	520	85	18
	Injectés	2400	90	22
24	Témoins	470	152	26
	Injectés	780	130	25
42	Témoins	520	117	29
	Injectés	120	112	24

tion lorsque la thymidine tritiée est injectée à divers temps après l'injection de solution de caséine (moyenne de 6 rats).

12 heures = 2 %	3 jours = 9 %	6 jours = 5 %
1 jour = 1 %	4 jours = 12 %	7 jours = 5 %
2 jours = 7 %	5 jours = 9 %	8 jours = 4 %

En pourcentage la production est à son maximum du 3^e au 5^e jour, mais en valeur absolue, elle est plus forte vers le 5^e jour quand le nombre de divisions cellulaires revient vers la normale.

La question se pose de savoir si les cellules qui entrent en division pendant la poussée de divisions cellulaires qui suit l'injection de solution de caséine sont les mêmes qui donnent naissance à des cellules binucléées. Une portée de rats de 7 jours a été divisée en trois groupes de trois rats chacun. Un groupe reçoit l'injection de thymidine tritiée 12 heures après celle de solution de caséine (avant

Tableau 4. *Pourcentage des différentes classes cellulaires dans la population des cellules hépatiques marquées 8 jours après injection de thymidine tritiée à des rats de 7 jours (Moyenne de 3 rats pour chaque groupe)*

Groupe expérimental	Cellules hépatiques marquées		
	mono-nucléées 2n	bi-nucléées 2n	mono-nucléées 4n
Témoins	96 %	1 %	3 %
Thymidine tritiée injectée 12 heures après la solution de caséine	88,5 %	7,5 %	4 %
Thymidine tritiée injectée 20 heures après la solution de caséine	90 %	7 %	3 %

la stimulation). Un second la reçoit 20 heures après (au maximum de la stimulation). Le troisième groupe reçoit la thymidine sans avoir eu d'injection de solution de caséine. Ces rats sont sacrifiés 8 jours après.

L'étude de la population des cellules hépatiques marquées permet le pourcentage des cellules binucléées 2n et mononucléées 4n par la méthode caryométrique (c.f. Nadal et Zajdela, 1966a).

Les résultats sont donnés dans le tableau 3. Ils indiquent que les cellules qui se sont divisées pendant la période de stimulation ne sont pas spécialement candidates à devenir binucléées par la suite. Si cela était, on devrait observer une accumulation bien plus importante de cellules binucléées ou éventuellement polyploïdes marquées au bout de 8 jours et on pourrait s'attendre à une différence entre les rats dont les noyaux cellulaires ont été marqués 12 heures et 24 heures après l'injection de solution de caséine.

Discussion

Au terme de cette étude on peut opposer 2 comportements du tissu hépatique après injection de substance irritante.

Chez les rats de 7 à 10 jours, il y a d'abord une période de latence sans grande variation du nombre des cellules en phase S ou quelquefois une légère baisse. Elle est suivie entre la 16^e et la 18^e heure d'une augmentation brève et intense du nombre des cellules entrant en phase S. Les divisions cellulaires qui se seraient étalées sur 30 à 40 heures débutent en l'espace de 2 heures, donnant au tissu hépatique une importante avance de croissance. La dépression qui suit est plus importante que la stimulation.

A partir de la 4^e semaine de la vie du rat, les réactions sont moins régulières, la période de latence observée chez les jeunes rats est remplacée par une période de forte inhibition, le nombre des noyaux en phase S ne représente plus, vers la 12^e heure, que le quart du chiffre des témoins. La période d'augmentation du nombre des noyaux en phase S, qui suit, est plus tardive, plus étalée et manque parfois.

Pendant la phase dépressive qui suit la période de stimulation des divisions cellulaires, le comportement des rats âgés de 7 à 10 jours se rapproche beaucoup de celui des rats plus âgés.

L'hypothèse qui explique le mieux l'ensemble des résultats est celle d'un processus inhibiteur des divisions cellulaires hépatiques. Celui-ci existerait en permanence à partir de la quatrième semaine de la vie des rats et se manifesterait, après injection de produit irritant, par la période d'inhibition précoce et par l'atténuation de la poussée d'augmentation du nombre des divisions cellulaires. Il apparaîtrait chez les jeunes rats après la période de stimulation des divisions cellulaires qui suit l'injection de produit irritant et serait responsable de l'importance de cette période dépressive et de la faible action d'une seconde injection pendant cette période. L'existence d'un tel mécanisme inhibiteur s'accorderait avec les résultats des auteurs qui ont observé une activité inhibitrice du sérum de rat adulte et avec ceux des expériences de plasmaphérèse.

La stimulation des divisions cellulaires pourrait correspondre à une disparition de l'inhibition mais cette explication paraît moins vraisemblable pour les rats au

cours des 3 premières semaines de leur vie puisque, chez eux, l'inhibition est discrète sinon absente. L'existence de facteurs stimulants ne peut donc être éliminée. La réaction inflammatoire augmenterait leur production ou hâterait la transmission de leurs informations en faisant parvenir d'un seul coup les facteurs de stimulation qui seraient normalement arrivés d'une manière fractionnée.

Pendant les trois premières semaines de la vie du rat la multiplication des hépatocytes se fait selon le modèle habituel et une cellule mononucléée $2n$ se divise en deux cellules du même type. Les autres variétés cellulaires sont rares sans être totalement absentes. La production de cellules binucléées, premier stade du processus de polyploïdie hépatique, apparaît chez les rats dont le comportement après injection de substance irritante suggère la présence d'une inhibition. Ce sont les rats à partir de la 4^e semaine de leur vie et les rats de 7 à 10 jours au cours de la période de dépression qui suit la poussée de divisions cellulaires causée par injection irritante. La production des cellules binucléées paraît ainsi liée, d'une façon ou d'une autre, à l'existence des facteurs d'inhibition. Elle serait alors la conséquence d'une croissance hépatique soumise à l'alternance ou à la coexistence, d'une part de facteurs de stimulation, induits par les diverses influences somatiques, et, d'autre part, de facteurs inhibiteurs produits quand le tissu hépatique a atteint ou dépassé le niveau d'équilibre avec le reste de l'organisme.

Il convient de noter qu'après hépatectomie partielle chez le rat adulte la croissance hépatique reprend le type néonatal. Dans un tout premier stade les cellules binucléées existantes se transforment en cellules polyploïdes et il se forme quelques cellules binucléées nouvelles, mais ensuite la multiplication continue sans formation de nouvelles cellules binucléées ni variation de la polyploïdie jusqu'à ce que l'équilibre avec le reste de l'organisme soit de nouveau atteint (Nadal et Zajdela, 1966a). Ce type de croissance peut s'interpréter par une levée de l'inhibition à la suite du déficit en tissu hépatique.

La connaissance des réactions hépatiques induites par une inflammation localisée permettra peut être de reprendre sur de nouvelles bases l'étude des facteurs sanguins ou tissulaires intervenant dans la régulation de la division des hépatocytes. L'existence des réactions non spécifiques risque de faire attribuer à n'importe quel produit plus ou moins irritant une activité variable, stimulante, inhibitrice ou nulle, selon le délai choisi entre son injection et le sacrifice de l'animal. Mais la cinétique de ces variations non spécifiques est aisément prévisible chez les rats âgés de 7 à 10 jours. La sensibilité et la régularité des réactions de ces animaux les rendent particulièrement intéressants pour ce genre d'étude. D'autre part l'inflammation locale paraît avoir pour effet de renforcer l'action des facteurs inhibiteurs, et peut être stimulants, physiologiques. Cette propriété permettra peut-être une nouvelle approche dans l'identification des facteurs de régulation.

Références

- Adibi, S., Paschkis, K. E., Cantarow, A.: Stimulation of liver mitosis by blood serum from hepatectomized rats. *Exp. Cell Res.* **18**, 396—398 (1959).
Alston, W. C., Thompson, R. Y.: Humoral and local factors in liver regeneration. *Cancer Res.* **23**, 901—905 (1963).

- Beams, H. W., King, R. L.: Origin of binucleate and large mononucleate cells in the liver of the rat. *Anat. Rec.* **83**, 281—297 (1942).
- Blomkvist, K.: Growth stimulation in the liver and tumour development following intraperitoneal injections of liver homogenates in the rat. *Acta path. microbiol. scand., Suppl.* **121**, 1—65 (1957).
- Bucher, N. L. R.: Regeneration of mammalian liver. *Int. Rev. Cytol.* **15**, 245—300 (1963).
- Carriere, R.: The growth of liver parenchymal nuclei and its endocrine regulation. *Int. Rev. Cytol.* **25**, 201—277 (1969).
- Friedrich-Freska, H., Zaki, F. G.: Spezifische Mitose-Auslösung in normaler Rattenleber durch Serum von partiell hepatektomierten Ratten. *Z. Naturforsch.* **9b**, 394—397 (1954).
- Glinos, A. D.: The mechanisms of liver growth and regeneration. In: *The chemical basis of development*, p. 813—839 (W. D. McElroy and B. Glass, eds.). Baltimore, Maryland: John Hopkins Press 1958a.
- Liver regeneration and liver function. In: *Liver function*, p. 425—431, R. W. Brauer ed. Washington, D. C.: American Institute of biological sciences 1958b.
- Gey, G. O.: Humoral factors involved in the induction of liver regeneration in the rat. *Proc. Soc. exp. Med. Biol. (N.Y.)* **80**, 421—425 (1952).
- Grisham, J. W., Leong, G. F., Albright, M. L., Emerson, J. D.: Effect of exchange transfusion on labeling of nuclei with thymidine ^3H and on mitosis in hepatocytes of normal and regenerating rat liver. *Cancer Res.* **26**, Part 1, 1476—1485 (1966).
- Horvath, E., Kovaks, K.: Beiträge zur Rolle der Nebenniere in der Regeneration der Leber. *Z. ges. exp. Med.* **127**, 236—240 (1956).
- Hughes, P. E.: Humoral factors in liver regeneration. *Aust. Ann. Med.* **9**, 41—43 (1960).
- Jackson, B., Bohnel, E.: Liver mitotic rates and weights in young rapidly growing rats after serum injection. *Nature (Lond.)* **203**, 892—893 (1964).
- Jacobij, W.: Über das rhythmische Wachstum der Zellen durch Verdopplung ihres Volumens. *Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org.* **106**, 124—192 (1925).
- Lancker, J. L. van, Borison, H. L.: Incorporation of tritium labeled thymidine into rat liver DNA after exchange transfusion with blood of partially hepatectomized rats. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **51**, 171—172 (1961).
- Laquerriere, R., Laumonier, R.: *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **154**, 286—289 (1960).
- Leong, G. F., Grisham, J. W., Hole, B. V., Albright, M. L.: Effect of partial hepatectomy on DNA synthesis and mitosis in heterotopic partial autografts of rat liver. *Cancer Res.* **24**, 1496—1501 (1964).
- Lonney, W. B.: The replication of deoxyribonucleic acid in hepatocytes. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **46**, 690—698 (1960).
- McDonald, R. A., Rogers, A. E.: Control of regeneration of the liver. Lack of effect of plasma from partially hepatectomized, cirrhotic and normal rats upon DNA synthesis and mitosis in rat liver. *Gastroenterology* **41**, 33—38 (1961).
- McJunkin, F. A., Breuhaus, H. C.: Homologous liver as a stimulus to hepatic regeneration. *Arch. Path.* **12**, 900—908 (1931).
- Molimard, R.: La régulation des masses parenchymateuses dans l'organisme. Essai d'application à l'étude clinicobiologique de la cirrhose éthylique chez l'homme. *Bull. Soc. med. Hôp. Paris* **75**, 893—901 (1959).
- Moolten, F. L., Bucher, N. L. R.: Regeneration of rat liver: transfer of humoral agent by crosscirculation. *Science* **158**, 272—274 (1967).
- Moya, F. J.: Inhibition of growth by post hepatectomy blood serum. *Exp. Cell Res.* **31**, 457—469 (1963).
- Nadal, C.: Influence des facteurs inflammatoires aspécifiques sur le développement de la polyploïdie hépatique du rat. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **261**, 790—792 (1965).
- Zajdela, F.: Polyploïdie somatique dans le foie de rat. I. Le rôle des cellules binucléées dans la genèse des cellules polyploïdes. *Exp. Cell Res.* **42**, 99—116 (1966a).
- — Polyploïdie somatique dans le foie de rat. II. Le rôle de l'hypophyse et de la carence protéique. *Exp. Cell Res.* **42**, 117—129 (1966b).
- Naora, H., Naora, H.: Synthesis of deoxypentose nucleic acid in liver cell of rat following plasmapheresis. *Gann* **48**, 255—261 (1957).

- Post, J., Hoffman, J.: Changes in the replication time and patterns of the liver cell during the life of the rat. *Exp. Cell Res.* **36**, 111—123 (1964).
- Rigler, R. J.: Die Wirkung entzündlicher Reaktionen auf Kernzahl, deoxyribonukleinsäuregehalt und Trockengewicht der Mäuseleberzelle. *Exp. Cell Res.* **30**, 160—170 (1963).
- Rogers, A. E., Shaka, J. A., Pechet, G., McDonald, R. A.: Absence of a humoral factor affecting hepatic regeneration in parabiotic rats. *Amer. J. Path.* **39**, 561—578 (1961).
- Saetren, H.: A principle of autoregulation of growth. Production of organ specific mitose-inhibitors in kidney and liver. *Exp. Cell Res.* **11**, 229—232 (1956).
- Smythe, R. L., Moore, R. O.: A study of possible humoral factors in liver regeneration in the rat. *Surgery* **44**, 561—569 (1958).
- Stich, H. F.: Regulation of mitotic rate in mammalian organisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **90**, 603—609 (1960).
- Florian, M. L.: The presence of a mitosis inhibitor in the serum and liver of adult rats. *Canad. J. Biochem.* **36**, 855—859 (1958).
- Sudweeks, A. D., Hill, R. B.: Control of liver cell replication by albumin need. *J. Cell Biol.* **34**, 404—406 (1967).
- Survis, J., Kennedy, R., Hass, G. M.: Humoral factors in liver regeneration. *Fed. Proc.* **21**, 301 (1962).
- Teir, H., Ravanti, R.: Mitotic activity and growth factors in the liver of the white rat. *Exp. Cell Res.* **5**, 500—507 (1953).
- Violainen, M.: Mitotic response in liver autografts after partial hepatectomy in the rat. *Exp. Cell Res.* **33**, 588—591 (1964).
- Wilson, J. W., Leduc, E. H.: Mitotic rate in mouse liver following intraperitoneal injection of liver, kidney and egg yolk. *Anat. Rec.* **97**, 471—493 (1947).
- Zimmerman, M., Celozzi, E.: Stimulation of cell divisions in normal rat liver by a factor in serum from hepatectomized rats. *Fed. Proc.* **19**, 139 (1960).

Dr. C. Nadal
Unité de Physiologie Cellulaire, Inserm
Institut du Radium
F-91 Orsay/France

